

008469147

WPI Acc No: 1990-356147/199048

Dihomo-gamma-linolenic acid prodn. - by cultivating microorganism with ability to produce cpd. on culture medium contg. specified alkoxy aromatic cpd.

Patent Assignee: IDEMITSU PETROCHEM CO (IDEM)

Inventor: NAKAJIMA T; SHIMAUCHI T

Number of Countries: 011 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
EP 399494	A	19901128	EP 90109800	A	19900523	199048	B
JP 3049688	A	19910304	JP 89183789	A	19890718	199115	
JP 3072892	A	19910328	JP 90131357	A	19900523	199119	
US 5093249	A	19920303	US 90524647	A	19900516	199212	
JP 2740854	B2	19980415	JP 89183789	A	19890718	199820	
JP 2958361	B2	19991006	JP 90131357	A	19900523	199947	

Priority Applications (No Type Date): JP 89183789 A 19890718; JP 89128916 A 19890524; JP 90131357 A 19900523

Cited Patents: Jnl.Ref; EP 155420; EP 252716; EP 304049

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 399494 A 13

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL SE

US 5093249 A 6

JP 2740854 B2 4 C12P-007/40 Previous Publ. patent JP 3049688

JP 2958361 B2 6 C12P-007/64 Previous Publ. patent JP 3072892

Abstract (Basic): EP 399494 A

Producing dihomo-gamma-linolenic acid comprises cultivating a microorganism having an ability to produce dihomo-gamma-linolenic acid

on a culture medium contg. a cpd. of formula (I) or curcumene, and then recovering dihomo-gamma-linolenic acid from the cultivated prod. R1 = lower alkyl; R2 = OH, alkyl, alkoxy, alkenyl or oxyalkyl; n = 0-5. Also claimed is an inhibitor for unsaturation at 4-5 position of fatty acids contg. cpd. (I).

USE/ADVANTAGE - Cpd. (I) or curcumene is added to the culture medium in an amt. of 0.01-10 g/l of the culture medium. Cpd. (I) or curcumene has an ability to inhibit an unsaturation reaction at a delta-5 position of fatty acids.

Abstract (Equivalent): US 5093249 A

Prepn. of dihomo-gamma-linolenic acid (I) comprises cultivating Conidiobolus nanodes GBS 183/62 or Conidiobolus Lampragues (ATCC 12585) on a culture medium contg. a cpd. (II) chosen from diethoxybenzene, methoxyphenol, t-butylhydroxy anisole and eugenol and recovering (I).

Pref. the culture medium contains 0.01-10, esp. 0.05-2 g/l of (II). Pref. cultivation is carried out at 10-40 deg. C for 1-20 days.

ADVANTAGE - (II) inhibits unsaturation reaction at the delta 5 position.
(6pp)

Derwent Class: B05; D16; E17

International Patent Class (Main): C12P-007/40; C12P-007/64

International Patent Class (Additional): C12P-007/62; C12R-001/64;

C12P-007/40; C12R-001-645; C12P-007/64

?map anpryy temp s4

④ 日本国特許庁 (JP) ⑤ 特許出願公開
 ⑥ 公開特許公報 (A) 平3-49688

⑦ Int. Cl. 5 標識記号 廷内整理番号 ⑧ 公開 平成3年(1991)3月4日
 C 12 P 7/40 6742-4B
 /(C 12 P 7/40
 C 12 R 1:645)

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全5頁)

⑨ 発明の名称 ジホモーアーリノレン酸の製造法および脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤
 ⑩ 特願 平1-183789
 ⑪ 出願 平1(1989)7月18日
 ⑫ 発明者 中島 寿昭 千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内
 ⑬ 出願人 出光石油化学株式会社 東京都千代田区丸の内3丁目1番1号
 ⑭ 代理人 弁理士 久保田 雄郎

四月 細田 宗

1. 発明の名称
ジホモーアーリノレン酸の製造法および
脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤

2. 特許請求の範囲

(1) ジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を、クルクミンを添加した培地で培養し、培養物からジホモーアーリノレン酸を採取することを特徴とするジホモーアーリノレン酸の製造法。

(2) クルクミンを主成分とする脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はジホモーアーリノレン酸(△8, 11, 14エイコサトリエン酸)を発酵法により安価に大量生産する方法および微生物や動物細胞の脂肪酸に対する△5位不飽和化反応抑制剤に関する。

(従来の技術および発明が解決しようとする課題)

ジホモーアーリノレン酸を生産する方法として、グルコースを主原料とする培地にゴマ油を添加し

てモルティエラ属微生物を培養することにより、ジホモーアーリノレン酸を含む脂質を生産する方法が知られている(H.Yamada, et al., J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 66, p237~241(1989))。

また、脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤としては、ゴマ油中のセサミン、エビセサミンが知られている(H.Yamada, et al., 日本農芸化学会誌63卷, p676(1989))。しかしながら、セサミンやエビセサミンの純品を大量に探ることはコスト的に高く、実用性に劣るという欠点があった。

(課題を解決するための手段)

そこで、本発明者はジホモーアーリノレン酸の発酵法による大量生産について観察研究した結果、特定の化合物を培地に添加することにより目的を達成できること、並びに該化合物が脂肪酸の△5位不飽和化反応を抑制する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を、クルクミンを添加した培地で培養し、培養物からジホモーアーリノレン酸

特開平3-49688(2)

を採取することを特徴とするジホモーアーリノレン酸の製造法、およびクルクミンを主成分とする脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤を提供するものである。

本発明で使用する微生物は、ジホモーアーリノレン酸生産能を有するものであればよく、例えばコニディオボラス属やモルティエレラ属に属するジホモーアーリノレン酸生産能を有する微生物を挙げることができる。具体的には、コニディオボラス・ナノデス(*Conidiobolus nanodes*)CBS 183/62、コニディオボラス・ランブラウジエス(*Conidiobolus lameraeus*)ATCC 12585、モルティエレラ・アルビナ(*Mortierella alpina*)IFO 8568等が挙げられる。

本発明では、上記微生物を培養してジホモーアーリノレン酸を製造するための培地に、クルクミンを含むことが必須である。クルクミンはウコンに含まれる黄色色素の主成分であり、入手が容易である上に、純品も安価で手に入る。ウコンはカレー粉、たくあん、漬物等の着色料として用いられており、その安全性にも問題はない。培地中添

加するクルクミンは、ウコン粉末またはクルクミン純品のいずれであってもよいが、不純物等の影響を考慮するとクルクミン純品の方が好ましい。クルクミンの添加量は培地1ℓあたり0.01～1.0g好ましくは0.05～2gである。クルクミンの添加方法は、エタノールやジクロロメタンなどの適当な溶媒に溶解して添加することもできるが、培地の培养液として用いる油脂に均一に混じして添加するのが好ましい。また、添加する時期は培養を始める前が好ましいが、培養途中から加えてもよい。

上記微生物を培養するための培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含むものが用いられる。炭素源としては、ブドウ糖、オリーブ油、サフラワー油、アーリノレン酸含有油などの炭水化合物や油脂等が用いられる。ここでアーリノレン酸含有油としては、月見草油、オリジナル油等の植物油；モルティエレラ(*Mortierella*)属、ムコール(*Mucor*)属、カニンガメラ(*Cunninghamella*)属等に属する糸状菌から抽出された微生物油があげ

られる。また、窒素源としては酵母エキス、ペプトン、大豆粕などの有機窒素源が好ましく、無機塩類としてはリン酸カリウム(KH₂PO₄)、鉄塩(F₂SO₄·7H₂O)、マグネシウム塩(Mg₂SO₄·7H₂O)、亜鉛塩(ZnSO₄)などが用いられる。その他、必要に応じて微量元素や栄養源を添加することもできる。

上記微生物の培養は通常、液体培地にて振とう培養や通気搅拌培養などにより行なわれる。培養条件は培養温度10～40℃、好ましくは20～30℃、培養日数は1～20日であり、コニディオボラス属に属する微生物を用いる場合は3～10日が好ましいが、これらの条件は用いる微生物の性質等を考慮してジホモーアーリノレン酸の生産量が高くなるように設定すればよい。

このようにして培養物中にジホモーアーリノレン酸が生産されるので、培養物からジホモーアーリノレン酸を採取する。ジホモーアーリノレン酸は培養物よりそのまま採取してもよいが、培養物には炭素源として加えた油脂等が含まれるため、

培養物より固体を分離し、この固体からジホモーアーリノレン酸を採取するのが好ましい。ジホモーアーリノレン酸の採取は、溶媒抽出やクロマトグラフィーなどの常法により行なわれる。

次に、本発明の脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤について説明する。本発明でいう△5位不飽和化反応とは、例えばジホモーアーリノレン酸からアラキドン酸への変換反応を指す。

本発明の脂肪酸の△5位不飽和化反応抑制剤は、クルクミンを主成分とするものである。その使用にあたっては、微生物や動物細胞に脂肪酸をえたものにクルクミンを0.01～1.0g/ℓ乾燥固体、好ましくは0.1～2.0g/ℓ乾燥固体を添加すればよく、これにより微生物や動物細胞の脂肪酸に対する△5位不飽和化反応を抑制することができる。

(実施例)

次に、本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

特開平3-49668(3)

比較例1

第1表に示した組成の培地に炭源として1.6%ターリノレン酸含有油（オレイン酸4.0%，リノール酸1.0%，ターリノレン酸1.6%）を3.0g／2加えた培地を作製した。この培地100mLを500mLの三角フラスコに入れ、121℃で1.5分間滅菌処理した。このフラスコにコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、30℃で4日間振とう培養した。

第1表 培地組成

KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
ペプトン	10 g
イーストエキストラクト	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
蒸留水	1 L

培養終了後、遠心分離により液體を集めし、リソ酸鈉衝液（pH 7.0）を用いて洗浄した後、吸引過により固体を採取した。この固体をアルミ

製のカップに入れ、ガラスビーズ、メクノール、クロロホルムを加えてホモジナイザーで固体を破壊し、固体内の脂質を抽出した。抽出した脂質をBF₃-メタノールを用いてメチルエステル化して、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べた結果を第2表に示す。

なお、ジホモーアーリノレン酸の同定は以下の方法により行なった。ジホモーアーリノレン酸の標品と本サンプルを混合してキャビラリーガスクロマトグラフィー（カラム：PEG 20M）で分析したところ、ジホモーアーリノレン酸部分のピークが大きくなつた。また、本サンプルを胡麻油含浸透析クロマトグラフィーによりトリエン部分を分取した。この部分にはアーリノレン酸とジホモーアーリノレン酸が含まれていた。分取したトリエン部分から液体クロマトグラフィー（カラム：ODS）によりジホモーアーリノレン酸を分取した。このジホモーアーリノレン酸をビコリニル試薬体化し、キャビラリーガスマススペクトラムにより同定した。その結果、△8, 11, 14エ

イコサトリエン酸、すなわちジホモーアーリノレン酸であることが確認された。

実施例1

比較例1と同様の培地を作成し、これに第2表に示した所定量のクルクミンを添加した。添加方法は、所定量のクルクミンをエタノールに溶解したものをお500mLフラスコに入れ、さらに1.6%ターリノレン酸含有油3gを加え、窒素気流下でエタノールをとばしてクルクミンを油に混合した後、ここに第1表に示した培地を100mL加えて培地を作成した。この培地を滅菌後、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で固体内脂肪の脂肪酸組成を分析した。この結果を第2表に示す。

第2表

添加量(g/L)	比較例1				
	0	0.2	0.3	0.5	0.7
脂質収量(g/L)	22.0 6.8	27.0 8.3	30.6 11.16	27.9 8.3	16.4 5.1
脂肪酸組成(%)					
オレイン酸(C _{18:1})	1.1	—	0.9	—	—
リノール酸(C _{18:2})	24.1	—	24.6	—	—
アラキド酸(C _{20:1})	4.1	—	3.2	—	—
アラキド酸(C _{20:2})	27.0	—	26.3	—	—
リノール酸(C _{18:3})	6.1	—	5.7	—	—
γ-リノール酸(C _{18:3})	6.3	—	4.0	—	—
α-リノール酸(C _{18:3})	3.0	—	4.3	—	—
γ-リノール酸(C _{18:3})	4.1	8.2	15.7	16.1	14.0
γ-リノール酸(C _{18:3})	15.7	8.9	9.6	4.2	4.6
α-リノール酸(C _{18:3})	3.2	—	3.3	—	—
その他	5.3	—	2.4	—	—
リノール酸 収量(g/L)	—	0.54	1.76	1.37	0.72

特開平3-49688(4)

第2表より明らかのように、クルクミンの添加によってジモモーリノレン酸の含有率が顯著に上昇し、アラキドン酸の含有率が相対的に低下しており、△5位不飽和化反応が特異的に阻害されていることがわかった。

実施例2および比較例2

第1表に示した培地にグルコース1.0 g/Lと1.6%ヤーリノレン酸油2.0 g/Lを加えた培地(比較例2)および前記比較例2の培地に実施例1と同様の方法によりクルクミン0.3 g/Lを加えた培地(実施例2)を作成し、121℃で15分間滅菌した。この培地にコニディオボラス・ナノデス CBS 183/62 を接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第3表に示す。

実験	菌体収量 (g/L)				油脂吸収量 (g/L)				含有率(%)				收率率(%)			
	ジモモーリノレン酸含有率(%)	アラキドン酸含有率(%)	菌収量(g/L)	油吸収量(g/L)												
比較例2	11.1	5.5	3.8	0.21	31.1	1.70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
実施例2	13.8	5.6	6.9	0.46	26.8	1.49	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

実験例3

第1表に示した培地の3倍濃度の培地に1.6%ヤーリノレン酸含有油を9.0 g/Lを加え、さらにクルクミンを実施例1と同様の方法により0.5 g/Lを加えた培地を作成した。この培地6 Lを10 Lジャーファメンターに入れ、121℃で15分間滅菌した。次いで、コニディオボラス・ナノデス CBS 183/62を第1表に示した培地に1.6%ヤーリノレン酸含有油3.0 g/Lを加えた培地600 mLで前培養したものと、上記ジャーファメンターに全量接種し、30℃で4日間振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。その結果、アラキドン酸含有率は1.0%，ジモモーリノレン酸含有率は1.5%、ジモモーリノレン酸吸収量は培地1 Lあたり3.3 gであった。

実験例4

実験例1において、添加したクルクミン量を0.7 g/Lとしたことおよび接種した微生物をコニディオボラス・ラングラウジエス ATCC 12585 とし

たこと以外は実施例1と同様の操作を行なった。その結果、菌体収量は20.3 g/L、油吸収量は6.0 g/L、ジモモーリノレン酸含有率は9.0%，ジモモーリノレン酸吸収量は0.54 g/L、アラキドン酸含有率は8.8%であった。

実験例5、6および比較例3、4

第1表に示した培地に1.6%ヤーリノレン酸含有油3.0 g/Lを添加した培地(比較例3、4)、第1表に示した培地に1.6%ヤーリノレン酸含有油3.0 g/Lおよびクルクミン0.5 g/Lを添加した培地(実施例5、6)を作成し、これらの培地にモルティエレラ・アルビナ IPO 8568 またはモルティエレラ・エロンガータ IPO 8570 を接種し、20℃で第4表に示した所定日数振とう培養した。培養終了後、比較例1と同様の方法で菌体内脂質の脂肪酸組成を分析した。この結果を第4表に示す。

特開平3-49688 (5)

第4表

接種した 菌名	培養日数 (日)	固体収量 (g/L)	セスキ-テグリシン 含有率(%)	ジオレイン酸 含有率(%)
比較例3 IFO 8568	15	18.7	0.4	1.1
実施例5 IFO 8568	15	13.2	1.9	1.3
比較例4 IFO 8570	10	17.3	0.8	2.3
実施例5 IFO 8570	10	14.1	1.8	0.2

次より明らかなように、モルティエレラ属微生物を用いた場合においてもアラキドン酸よりもジオモーアリノレン酸含有率の高い油脂を得ることができた。

【発明の効果】

本発明によれば、微生物固体内のアラキドン酸含有率を下げ、ジオモーアリノレン酸含有率を上げることができるので、ジオモーアリノレン酸を効率よく安価に大量生産である。また、本発明によれば脂肪酸の△5位不飽和化反応を低成本に抑制することができる。得られたジオモーアリノレン酸は医薬、生化学用試薬として有用である。

特許出願人 出光石油化学株式会社

代理人 弁理士 久保田 誠 郎

